

① 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—135590

⑤ Int. Cl.³
C 12 N 9/82
// A 61 K 37/54
C 12 N 9/06

識別記号
ADM
ADU

庁内整理番号
7421—4B
6617—4C
6617—4C
7349—4B

④ 公開 昭和55年(1980)10月22日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ 修飾アスパラギナーゼ及びウリカーゼ並びに
その製法

横浜市西区老松町30番地2の40
1

⑦ 出 願 人 美浜久春

東京都世田谷区梅丘2丁目23番3
6号

② 特 願 昭54—41203

② 出 願 昭54(1979)4月5日

⑦ 発 明 者 稲田祐二

明 細 書

1 発 明 の 名 称

修飾アスパラギナーゼ及びウリカーゼ並びに
その製法

2 特 許 請 求 の 範 囲

1 L—アスパラギナーゼ又はウリカーゼ分子
中のアミノ基が

式



(ここに、Rは分子量2000以上の水溶性高
分子残基を示す。)を有する基で部分的に置
換された抗原性を低下又は消失させた修飾ア
スパラギナーゼ及びウリカーゼ。

2 RがO—置換—ポリエチレングリコール残
基である特許請求の範囲第1項記載の修飾ア
スパラギナーゼ及びウリカーゼ。

3 Rが分子量5000以上のO—メトキシポリ
エチレングリコール残基である特許請求の範
囲第1項記載の修飾アスパラギナーゼ及びウ

リカーゼ。

4 アスパラギナーゼ分子中のアミノ基の約50
%が分子量5000以上の2,4—ビス(0—メ
トキシポリエチレングリコール)—3—トリ
アジン—6—イルで置換された特許請求の範
囲第1項記載の修飾アスパラギナーゼ。

5 L—アスパラギナーゼ又はウリカーゼに分
子量2000以上の2,4—ビス(0—置換—ポ
リエチレングリコール)—6—クロル—3—
トリアジンを反応させることを特徴とする、
アスパラギナーゼ又はウリカーゼ分子中のア
ミノ基が部分的に置換された抗原性を低下又
は消失させた修飾アスパラギナーゼ及びウリ
カーゼの製法。

3 発 明 の 詳 細 な 説 明

本発明は抗原性を低下又は消失させた修飾ア
スパラギナーゼ及びウリカーゼ並びにそれら
の製法に関し、医薬としての安全性を高めたも
のである。

L—アスパラギナーゼは分子量約1&4万で4

(1)

(2)

つの同一のサブユニットよりなる蛋白質であり、
L-アスパラギンをL-アスパラギン酸とアン
モニアに加水分解する反応を触媒する酵素であ
る。ある種の腫瘍細胞はL-アスパラギンを必
須栄養原の1つとすることにより、この栄養原
をL-アスパラギナーゼを用いて分解し、腫瘍
細胞の増殖を抑えたと共に死滅させる目的で同
酵素は抗腫瘍剤として用いられている。

大腸菌およびその他の微生物より生産された
L-アスパラギナーゼはヒトにとつて非自己で
あるため、同酵素の体内投与によつて免疫系を
刺激し、多量の抗体を産生する。そのため腫瘍
患者に同酵素を投与して一時的に病気がなおつ
た患者が同病を再発した場合に、再度のアスパ
ラギナーゼ投与は不可能であるため、その治療
が著しくさまたげられ、過つて投与した場合に
はアナフィラキシーショックを起し、生命に重
大な危険を与える。

即ち、L-アスパラギナーゼ分子の表面には
ヒトにとつて非自己と認識される抗原決定部位

(5)

現在ウリカーゼは肝臓及び酵母より単離精製
され、臨床検査用として尿酸の定量に使用され
ている。この酵素を直接血液の中に投与し、血中
の尿酸を分解することによつて痛風を治療しよ
うとする考えは、そのウリカーゼがヒト以外の
動物より単離されたものであるがため、ヒトに
とつて異種の蛋白質であるので抗体を産生し、
再度のウリカーゼの投与によつてアナフィラキ
シー・ショックを起し死に至らしめる。その原
因はウリカーゼ分子の表面にはヒトにとつて非
自己と認識される抗原決定部位が存在するため
であり、その部位は2〜3個のアミノ酸残基に
よつて構成されていると考えられる。ウリカー
ゼの抗原性の低下あるいは消失は、ヒトにとつ
て非自己を自己に変換し、痛風患者（高尿酸血
症）への再投与を可能にする。

本発明者は、先にL-アスパラギナーゼ及び
ウリカーゼ分子中に存在するアミノ酸残基を、

(5)

が少くとも7〜8ヶ存在し、それぞれの部位は
2〜3個のアミノ酸残基によつて構成されてい
ると考えられている。

L-アスパラギナーゼの抗原性を低下あるい
は消失させることは、ヒトにとつて非自己であ
つたL-アスパラギナーゼを自己に変換させる
ことであり、連続投与ができなかつた従来のア
スパラギナーゼ療法を更に発展させ、腫瘍患者
への再投与を可能にするための改良が望まれて
いる。

一方、ウリカーゼは分子量約12万で、4個
のサブユニットよりなる酵素蛋白質であり、尿
酸をアラントインと過酸化水素と炭酸ガスに分
解する反応を触媒する蛋白質である。ヒト及び
靈長類ではウリカーゼ活性が低く、尿酸がプリ
ン代謝の主な最終産物であると考えられている
が、高尿酸血症の患者においては、組織および
血液中に多量に尿酸が蓄積され種々の疼痛を覚
える。現在その治療が強く望まれているのに根
本的な治療法は確立されていない。

(4)

式



（ここに、Rは分子量2000以上の水溶性高
分子残基を示す）

を有する基で部分的に置換することによつて、
酵素活性を保持しながら抗原性を著しく低下又
は消失させることができることを見出し、特
許出願した（特願昭53-26543及び特願昭54-
6787 参照）。

これら先の発明においては、L-アスパラギ
ナーゼ又はウリカーゼの表面をヒゲ状の高分子
残基で覆うことによつて、抗原抗体反応を阻止
するものであつて、酵素活性を保持したままに
抗原性を消失させることに特徴がある。しかし
ながら、抗原性を消失させるためには酵素活性
も又かなり低下する欠点があつたため、なお改
良する必要があつた。

本発明者は研究の結果、2本鎖の水溶性高分
子残基を有するトリアジンをアスパラギナーゼ

(6)

又はウリカーゼに反応させることによつて、1本鎖の水溶性高分子残基を有するトリアジンと同酵素に反応させた場合に比べ同酵素のアミノ酸残基の修飾数を減らすことができ、また酵素表面を水溶性高分子で覆う効果が増加すると共に、酵素活性の低下を抑制することに成功した。

即ち、本発明はL-アスパラギナーゼ又はウリカーゼ分子中のアミノ基が

式

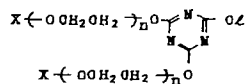


(ここに、Rは分子量2000以上の水溶性高分子残基を示す)

を有する基で部分的に置換された抗原性を低下又は消失させた修飾アスパラギナーゼ及びウリカーゼ並びにそれらの製法である。

前記水溶性高分子残基の例は、分子量2000以上のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン又はカルボキシメチルセルロースなどであり、特にポリエチ

(7)



(8)

(Xはマスクのため結合している置換基、例えばメチル基を示す)反応は塩基の存在下還流温度で行なわれる。

次にpH10に保つたL-アスパラギナーゼ又はウリカーゼ溶液に、2,4-ビス(0-置換ポリエチレングリコール)-6-クロル-8-トリアジン(8)をアスパラギナーゼ又はウリカーゼ分子中に存在するアミノ基当り1.5~1.5倍量(モル比)を蛋白質の変性を起こさない条件下で反応させることによつて、アスパラギナーゼ又はウリカーゼ分子中のアミノ基の部分的に置換された本発明修飾アスパラギナーゼ及びウリカーゼ(9)が得られる。

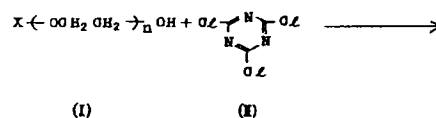
(9)

特開昭55-135590(3)

レングリコールが好ましい。これら水溶性高分子の一方の末端はマスクされていることが好ましく、例えばメチル、エチル、プロピルのようなアルキル基、又はアセチル、ベンゾイルのようなアシル基でマスクされている。即ち例えば0-置換ポリエチレングリコール、特に0-メトキシポリエチレングリコールが用いられる。

本発明の修飾アスパラギナーゼ及びウリカーゼの製法の1例を示す。

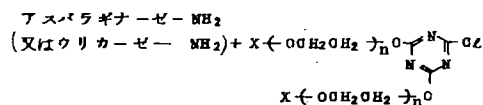
分子量2000以上の0-置換-ポリエチレングリコール(1)と2,4,6-トリクロル-8-トリアジン(II)とを反応させることによつて、2,4-ビス(0-置換ポリエチレングリコール)-6-クロル-8-トリアジン(III)が製造される。



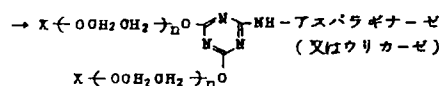
(I)

(II)

(8)



(III)



(IV)

本発明の修飾アスパラギナーゼ又はウリカーゼは、その分子量を測定すると、アスパラギナーゼ又はウリカーゼの分子量それぞれ18.4万又は1.2万と結合した化合物(IV)の分子量の合計に一致していることにより確認される。

本発明の修飾アスパラギナーゼについて、前記化合物(IV)の付加率は、未反応のアミノ基をトリニトロベンゼンスルホン酸を用いて測定する方法により行い、アスパラギナーゼ分子中の結合したアミノ基の数を測定した。酵素活性の測

(10)

定は、L-グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼを用い、リンゴ酸の生成に伴うNAD⁺の変化量を分光学的に測定する方法(A法)およびアスパラギン酸とヒドロキシアミン共存下における同酵素によるアスパラギン酸ヒドロキサメートの生成を塩化第二鉄により発色させる方法(B法)により測定した。更に抗原性の測定は、ウサギをL-アスパラギナーゼで免疫した抗血清を用い、抗原-抗体反応により生ずる沈澱量を測定する方法により行い、抗体との結合能(抗原性)を測定した。

実施例の方法により製造された本発明の修飾アスパラギナーゼについて、酵素活性及び抗体との結合能を測定した結果は次表のとおりである。

PEG ^{a)} (MW)	モル比 ^{b)} PEG ₂ /-NH ₂	結合したア ミノ基の数 ^{c)}	酵素活性		抗体との 結合能
			A法	B法	
—	0	0	100	100	100
5000	3	20	37	32	89
"	5	46	23	25	86
"	10	48	21	21	76
"	125	50	13	21	57
"	15	52	8	15	0

リアジン365mgを加え、1昼夜80℃で蒸流下反応させた。反応残留物を除去し、石油エーテル300mlを加えて沈澱を生ぜしめ、沈澱を数回石油エーテルで洗い、2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロル-8-トリアジンを製造した。

実施例1

L-アスパラギナーゼ10mgを含む0.1M緩う酸緩衝液(pH10)2mlに、上記により製造した2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロル-8-トリアジンを、アスパラギナーゼ分子中のアミノ基に対し15倍モル比加え、37℃で1時間反応させた。常法により精製し、白色粉末の修飾アスパラギナーゼを得た。このものの分子量は60万であり、アミノ基の分析の結果、52個が結合していたので、付加部分の分子量 $52 \times 5000 \times 2 \div 52$ 万とアスパラギナーゼの分子量18.4万との合計値とほぼ一致した。そして、このものは抗体との結合能は完全に消失しているが、酵素活性は

a) 0-メトキシポリエチレングリコールの分子数

b) アスパラギナーゼ分子中のアミノ基に対するPEG₂のモル比

c) アスパラギナーゼ分子中のアミノ基(92個)のうち、2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-8-トリアジン-6-イルが結合したアミノ基の数

本発明の修飾アスパラギナーゼは前述のとおり、酵素活性を保持しているながら、抗原性が完全に消失しているか著しく低下しているため安全性が高い。更に加えて、アミノ基が修飾をうけているので蛋白分解酵素による分解に対し抵抗性が大きく、例えばトリプシンを作用させても80%の活性が保持される特徴を有する。

参考例

10gの無水炭酸ソーダを含む100mlの無水ベンゼンに分子量5000のモノメトキシポリエチレングリコール20gを溶解し、80℃で30分間還流した後、2,4,6-トリクロル-8-トリ

(12)

A法で8%、B法で15%保持していた。

実施例2

ウリカーゼ5mgを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH10)に、上記により製造した2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロル-8-トリアジンをウリカーゼ分子中のアミノ基に対し10倍モル比加へ、37℃で1時間反応させた。常法により精製し、白色粉末の修飾ウリカーゼを得た。このものの分子量は45万であり、アミノ基の分析の結果30個が結合していたので付加部分の分子量 $30 \times 5000 \times 2 = 300000$ とウリカーゼの分子量12万との合計(42万)とほぼ一致した。そしてこのものは抗体との結合能は完全に消失しているが、酵素活性は15%以上保持していた。

(14)

(15)